3 月 March
2019, 62(3): 275 – 283
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.03.001

甘薯蚁象气味结合蛋白 CforOBP8 的基因表达谱及配体结合特性分析

贾小俭, 高 波, 马 娟, 李秀花, 陈书龙, 王容燕*

(河北省农林科学院植物保护研究所, 河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心,
农业部华北北部作物有害生物综合治理重点实验室, 河北保定 071000)

摘要:【目的】明确甘薯蚁象 *Cylas formicarius* 气味结合蛋白(odorant binding protein, OBP) OBP8 的基因表达谱及与配体化合物的结合特性。【方法】基于甘薯蚁象成虫转录组数据,利用 RT-PCR 方法从甘薯蚁象成虫触角中克隆了气味结合蛋白 OBP8 基因,并进行生物信息学分析;采用 qPCR 方法测定该基因在甘薯蚁象成虫触角、口器、翅和跗节中的表达谱;构建原核表达载体,进行诱导表达及蛋白纯化。利用荧光竞争结合实验测定纯化的重组蛋白与 16 种配体化合物(1 种性信息素和 15 种植物挥发物)的结合特性。【结果】获得甘薯蚁象气味结合蛋白基因 *CforOBP8*(GenBank 登录号: MH549528)的完整编码序列,其开放阅读框长 414 bp,编码 138 个氨基酸,预测分子量为 15.56 kD,等电点为 4.71,N 末端具有 21 个氨基酸组成的信号肽序列,蛋白序列具有 4 个保守的半胱氨酸,CforOBP8 属于 Minus-C OBPs 亚家族。荧光定量 PCR 结果表明,*CforOBP8* 在甘薯蚁象成虫触角中特异性表达,在其他组织中微量表达。SDS-PAGE 结果显示融合蛋白成功表达。CforOBP8 与配体化合物的结合力测试表明,CforOBP8 与性信息素(*E*)-2-丁烯酸顺-(*Z*)-3 十二烯基酯结合能力最强,解离常数 K_i 为 4.13 μmol/L;其次与 5 种植物挥发物也有一定的结合能力,依次为乙酸顺-3-己烯酯(K_i = 7.54 μmol/L)、柠檬烯(K_i = 15.23 μmol/L)、橙花醇(K_i = 16.31 μmol/L)、壬醛(K_i = 28.71 μmol/L)和苯乙醛(K_i = 29.54 μmol/L)。【结论】CforOBP8 可能是甘薯蚁象性信息素结合蛋白,并且在感受性信息素和寄主植物挥发物的过程中都发挥作用。

关键词: 甘薯蚁象; 气味结合蛋白; 性信息素; 表达谱; 荧光竞争结合实验

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)03-0275-09

Gene expression profiling and ligand binding characterization of the odorant binding protein CforOBP8 in *Cylas formicarius* (Coleoptera: Brentidae)

JIA Xiao-Jian, GAO Bo, MA Juan, LI Xiu-Hua, CHEN Shu-Long, WANG Rong-Yan* (Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Integrated Pest Management Centre of Hebei Province, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northern Region of North China, Ministry of Agriculture, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract:【Aim】This study aims to clarify the gene expression patterns of the odorant binding protein (OBP) OBP8 in *Cylas formicarius* and its ligand binding characteristics. 【Methods】Based on the transcriptome data of *C. formicarius* adults, the odorant binding protein OBP8 gene was cloned from the antenna of *C. formicarius* adults and subjected to bioinformatical analysis. The expression patterns of this

基金项目: 国家甘薯产业技术体系(CARS-10-B-16); 河北省财政专项(F19C10001, F18C10001, F17C10007)
作者简介: 贾小俭, 女, 1989 年 8 月生, 河北邯郸人, 硕士, 科研助理, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: jiaxiaojian0@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: rongyanw@163.com
收稿日期 Received: 2018-07-01; 接受日期 Accepted: 2018-11-20

gene in adult antennae, mouthparts, wings and tarsi of *C. formicarius* were assayed by qPCR. Prokaryotic expression vector was constructed, and the recombinant protein was expressed and purified. The protein binding characteristics of the purified recombinant protein with 16 ligand compounds (one sex pheromone and 15 different plant volatiles) were assayed by fluorescence competitive binding assay. 【Results】*CforOBP8* (GenBank accession no.: MH549528) of *C. formicarius* was successfully cloned and sequenced. Its open reading frame is 414 bp in length, encoding a protein of 138 amino acids with the predicted molecular weight of 15.56 kD and the isoelectric point of 4.71. The N-terminal signal peptide of CforOBP8 consists of 21 amino acids. The mature protein possesses four conserved cysteines and can be classified into the Minus-C OBPs subfamily. The qPCR results showed that *CforOBP8* was specifically expressed in the antenna of *C. formicarius* adults and slightly expressed in other tissues. SDS-PAGE analysis showed that the fusion protein was successfully expressed. The binding affinity assay of CforOBP8 to ligand compounds showed that CforOBP8 had the strongest binding affinity to sex pheromone (*Z*)-3-dodecen-1-yl(*E*)-2-butenoate with the dissociation constant (K_i) of 4.13 μmol/L, and a certain binding affinities to five plant volatiles including (*Z*)-3-hexen-1-ol acetate, limonene, nerol, nonanal and phenylacetaldehyde, with the K_i values of 7.54, 15.23, 16.31, 28.71 and 29.54 μmol/L, respectively. 【Conclusion】CforOBP8 might be a pheromone binding protein of *C. formicarius* and play dual roles in the perception of sex pheromones and plant volatiles.

Key words: *Cylas formicarius*; odorant binding protein; sex pheromone; expression profiling; fluorescence competitive binding assay

昆虫在长期进化过程中,其嗅觉系统对于昆虫寻找寄主植物、配偶和栖息场所等行为活动至关重要(Field *et al*., 2000)。昆虫气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)是一种低分子量蛋白,存在于昆虫嗅觉感器淋巴液中,能溶解并运输外界脂溶性分子,穿过嗅觉感器淋巴液到达嗅觉神经元树突膜上的气味受体,从而激活信号转导过程(Leal, 2013),对于昆虫与外界进行信息交流具有重要意义。随着基因组和转录组测序技术的快速发展,已在鳞翅目、直翅目、鞘翅目、双翅目、半翅目、膜翅目和同翅目 7 个目的多种昆虫触角中鉴定到大量的 OBP 基因,同时利用荧光竞争结合实验测定了 200 多种昆虫 OBPs 的结合功能(Zhou *et al*., 2009; Li *et al*., 2017)。

甘薯蚁象 *Cylas formicarius* 又称甘薯小象甲,隶属于鞘翅目(Coleoptera)三锥象科(Brentidae),是甘薯上的重要害虫。甘薯蚁象在我国南方薯区发生较为严重,广泛分布于福建、广东、广西、海南和台湾等甘薯产区(王容燕等, 2015)。甘薯蚁象成虫咬食薯块成许多小孔,并在表皮下产卵,而且啃食甘薯的茎蔓与叶柄的皮层,影响甘薯的生长发育。其幼虫在薯块内取食危害最为严重,常造成甘薯产量损失 20% 以上,甚至绝产(张润志, 2015)。甘薯蚁象的寄主范围较窄,只能在甘薯、砂藤及登瓜薯上完成其生活史。甘薯蚁象的卵、幼虫和蛹 3 个虫态均生活在薯块中,只有成虫在薯块外完成定位补充营养、寻找配偶交配、选择产卵场所等,因此成虫灵敏的嗅觉系统在蚁象的生存过程中发挥着重要的作用。前人已在寄主植物挥发物鉴定、蚁象成虫电生理活性的挥发物组分的筛选等方面做了大量研究(Wang *et al*., 2002; 贾小俭等, 2017)。昆虫 OBPs 是设计嗅觉引诱剂的良好靶标,所以有必要对嗅觉气味结合生理功能进行研究。目前对甘薯蚁象嗅觉相关蛋白基因功能的研究甚少。

甘薯蚁象转录组数据分析显示,甘薯蚁象 OBP8 基因的 RPKM(reads per kilobase per million mapped reads)值在雌雄虫中相对较高。为深入研究 CforOBP8 的功能,本研究通过克隆甘薯蚁象 CforOBP8 基因,利用 qPCR 分析其组织表达谱,通过原核表达和蛋白纯化获得 CforOBP8 重组蛋白,利用荧光竞争结合实验对该基因的功能进行了初步探讨,以期为阐明该虫嗅觉识别的分子机制及开展甘薯蚁象行为调控技术的开发和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

甘薯蚁象种群采自福建莆田,在室内用甘薯薯

块饲养。饲养条件:温度 28 ±0.5℃,相对湿度 55% ~ 65%,光周期 16L∶8D。

1.2　供试挥发性化合物

选取已报道甘薯蚁象的寄主植物甘薯茎叶及薯块中主要的挥发性化合物(王桂荣等, 2002; 贾小俭等, 2017)和甘薯蚁象性信息素组分(由广东省农业科学院植物保护研究所李敦松研究员提供)共计 16 种可能与甘薯蚁象行为相关的气味化合物为配体(表 2),于 Sigma 公司购置各配体化合物分析纯样品,以甲醇为溶剂,将各样品配成 1 mmol/L 的溶液,贮藏于 –20℃的冰箱中备用。

1.3　RNA 的提取和 cDNA 第 1 链的合成

收集甘薯蚁象雌雄成虫触角、口器、翅和跗节,其中触角和跗节各收集 50 对,翅 20 对,口器 20 枚,每个样品 3 次重复。将收集到的样品立即用液氮研制成粉末,参照 RNeasy Plus Mini Kit(全式金, 北京)提供的说明书提取总 RNA。经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性后,用反转录试剂盒(Clontech Co., 美国)合成 cDNA 第 1 链, –20℃保存备用。

表 1　引物序列及用途

Table 1　Primers and its use

引物 Primers	引物序列(5′–3′) Primer sequences	引物用途 Use of primers
F1	ATGATGGCCGGGAAATTGGT	*OBP*8 片段克隆
R1	TTACAAACCGTGCTCTTCTCGG	cDNA cloning of *OBP*8 fragment
qActin-F	TCTTGGGTATGGAAGCGTGT	qPCR
qActin-R	GCGGTGATTTCCTTCTGCAT	
qOBP8-F	GACTGGCATCAGGAATGTTTGGA	qPCR
qOBP8-R	AGAATATGTGCTCGTAGAACTTGTCG	
CforOBP8-F	GGATCCATGATGGCCGGGA AATTGG	原核表达
CforOBP8-R	AAGCTTCAAACCGTGCTCTTCTCGGTAG	Prokaryotic expression

下划线表示酶切位点。The restriction sites are underlined.

1.4　甘薯蚁象 OBP 基因的克隆

以 1.3 节合成的甘薯蚁象雌虫触角 cDNA 为模板,根据甘薯蚁象转录组测序注释到的候选 OBP8 基因序列设计特异性引物(表 1),扩增其完整编码序列。PCR 反应体系 15.0 μL: ddH_2O 6.4 μL, cDNA 模板 0.5 μL, 2 × Taq Mix 7.5 μL, F/R 引物(10 μmol/L)各 0.3 μL。反应条件: 94℃预变性 10 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 40 s, 30 个循环;之后 72℃延伸 5 min。采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,纯化回收目的片段。回收产物连接至 pMD-18T(TaKaRa,大连)载体上,转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 中,涂平板 37℃倒置培养 16 h 后,选取阳性单克隆菌液送上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。

1.5　甘薯蚁象 OBP 基因序列分析

利用 DNAMAN 4.0 软件对甘薯蚁象 OBP 基因进行序列比对,BLAST 在线程序(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)搜索同源序列,在线软件(http://www.Expasy.org/compute_pi/)对蛋白质的分子量和等电点等基本物理性状进行分析预测; IPSORT 在线程序(http://www.ipsort.hgc.jp/)分析蛋白质信号肽;使用 MEGA5.0 软件中的邻接法(neighbor-joining method, NJ method)构建系统发育树,进行 1 000 次重复构建。

1.6　qPCR 法甘薯蚁象 OBP 基因的表达谱

以 1.3 节合成的雌雄虫触角、口器、翅和跗节各部位 cDNA 稀释至 100 ng/μL 作为 qPCR 的模板,在 ECO 实时荧光定量 PCR 仪(Illumina Co., 美国)中进行。根据甘薯蚁象触角转录组数据信息,找出内参基因 *β-actin* 序列设计一对特异性引物,qPCR 所用引物序列见表 1。反应体系为 10.0 μL: ddH_2O 4.0 μL, cDNA 模板 0.6 μL, SYBR Premix Ex Taq (2 ×) 5.0 μL, 引物 qOBP8F/qOBP8R(10 μmol/L)各 0.2 μL。采用两步法标准程序进行扩增: 94℃变性 2 min, 然后进入 40 个循环,循环条件为: 95℃变性 15 s, 60℃退火并延伸 1 min。每个处理进行 3 次生物学重复,以 ddH_2O 作为空白对照模板。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$值法(Schmittgen and Livak, 2008)计算不同样品中甘薯蚁象 OBP 基因的表达量差异。

1.7　甘薯蚁象 OBP 基因的原核表达及纯化

使用带有 *Bam* Ⅰ 和 *Hand* Ⅲ 酶切位点的引物(表 1),以 1.3 节合成的雌虫触角 cDNA 为模板进行

PCR 扩增并纯化回收,将目的片段连接到 pMD-18T 载体上,然后转入大肠杆菌感受态细胞 DH5α 内,蓝白斑筛选后送去测序以获得序列正确的质粒。将重组质粒 pMD-18T/*CforOBP*8 为模板进行 PCR 扩增(反应体系及条件同 1.4 节),扩增产物纯化回收后连接到 pEasy-E1-Blunt 表达载体上,转化到 DH5α 感受态细胞内,经筛选获得测序正确的重组质粒并转入到 BL21(DE3)表达菌株中,培养后挑取单菌落于 5 mL 的 LB 培养基(含 Amp 50 μg/mL)中,37℃过夜振荡培养,次日将培养后的菌液按 1∶100(v/v)的比例接种到新鲜的 LB 培养基中,37℃振荡培养至 OD 值为 0.6 ~0.8 之间,加入 IPTG 终浓度为 1 mmol/L, 37℃ 180 r/min 诱导 6 h。

离心收集诱导好的含重组 CforOBP8 质粒的菌体,在 4℃条件下加入裂解液重悬菌体超声破碎,12 000 r/min 离心 10 min,分别取上清及沉淀进行 SDS-PAGE 电泳检测。参照 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化说明书进行亲和层析蛋白纯化,纯化后利用重组肠激酶(索莱宝,北京)切除 His-tag,再次纯化后用超滤凝缩管(Millipore,截留分子量为 10 kD,上海)定量至 1 mg/mL,置于 -80℃备用。

1.8 荧光竞争结合实验

在 20 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液中加入目的蛋白 CforOBP8,配成一定浓度的母液备用;配体化合物(表 2)及荧光探针 1-NPN(Sigma Co.,德国)分别溶于甲醇溶液中,配成 1 mmol/L 的母液备用。

先测定目的蛋白 CforOBP8 与 1-NPN 的结合曲线:向 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)中加入终浓度为 2 μmol/L 目的蛋白,然后依次加入 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 和 20 μmol/L 荧光探针 1-NPN,充分反应 2 min 后测定和记录其荧光强度并计算蛋白与 1-NPN 的解离常数 K_i。然后测定 CforOBP8 与气味配体的结合常数:加入 2 μmol/L CforOBP8 蛋白溶液和 2 μmol/L 荧光探针 1-NPN,在相同条件下记录初始荧光值,再将被测气味物质按终浓度 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 和 20 μmol/L 的浓度梯度加入到 1-NPN 和蛋白的混合液中,每次加入后反应 2 min,记录荧光值。每样品实验重复 3 次。假设甘薯蚁象 OBP 重组蛋白 CforOBP8 活性为 100%,且在饱和状态时其与配体的结合比例为 1∶1,然后根据 IC_{50}(荧光值下降到初始荧光值一半时配体化合物的浓度)计算配体与蛋白的解离常数(K_i)。公式为 $K_i = [IC_{50}]/(1+[\text{1-NPN}]/K_{\text{1-NPN}})$(Ban *et al*., 2003),其中[1-NPN]为未结合的 1-NPN 浓度,$K_{\text{1-NPN}}$ 为 1-NPN 与 CforOBP8 蛋白的解离常数。

1.9 数据分析

基因表达量数据采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,OBP8 在成虫不同组织间的表达量差异用单因素方差分析(ANOVA)及 LSD 法进行检验,在雌雄间的表达量差异用独立样本 *t* 检验(independent samples *t*-test)检测。

2 结果

2.1 甘薯蚁象气味结合蛋白基因的克隆与序列分析

克隆获得甘薯蚁象气味结合蛋白基因,命名为 *CforOBP*8(GenBank 登录号: MH549528)。序列分析显示,*CforOBP*8 基因开放阅读框(ORF)长 414 bp,编码 138 个氨基酸,预测分子量为 15.56 kD,等电点为 4.71,N 末端有 21 个氨基酸组成的信号肽,含有 4 个保守的半胱氨酸残基,属于 Minus-C OBPs 家族蛋白(图 1)。

选用鞘翅目其他昆虫的 Minus-C OBP 与甘薯蚁象 CforOBP8 共建系统发育树(图 2),结果显示: CforOBP8 与华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi* DarmOBP5 聚集在同一进化支上, CforOBP8 与 DarmOBP5 的同源性最高,氨基酸序列一致性为 53.0%。

2.2 甘薯蚁象 *CforOBP*8 的组织表达谱

利用 qPCR 测定了 *CforOBP*8 在雌雄成虫中的组织分布水平(图 3)。结果显示,*CforOBP*8 在雌雄成虫不同组织中均有表达,但在触角中的表达量最高,显著高于其他组织($P<0.05$)。*CforOBP*8 在雌虫触角中的表达量分别是口器、跗节、翅中表达量的 7.9, 31.6 和 30.7 倍,在雄虫触角中的表达量分别是口器、跗节、翅中表达量的 20.0, 50.0 和 2.5 倍。*CforOBP*8 在触角、口器和跗节中的表达量在雌雄间差异不显著($P>0.05$),但在翅中雄虫的表达量显著高于雌虫的($P=0.001$)。

2.3 CforOBP8 蛋白的原核表达与纯化

重组质粒 pEASY-E1-*CforOBP*8 转入表达菌株 BL21(DE3)经 IPTG 诱导出目的蛋白。SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白主要以包涵体形式表达,通过尿素变性、纯化及透析复性后用重组肠激酶切除 His-tag 标签,对切除标签后的蛋白进行再次纯化,在 15 kD 左右处出现预期的单一条带,用于荧光竞争结合实验(图 4)。

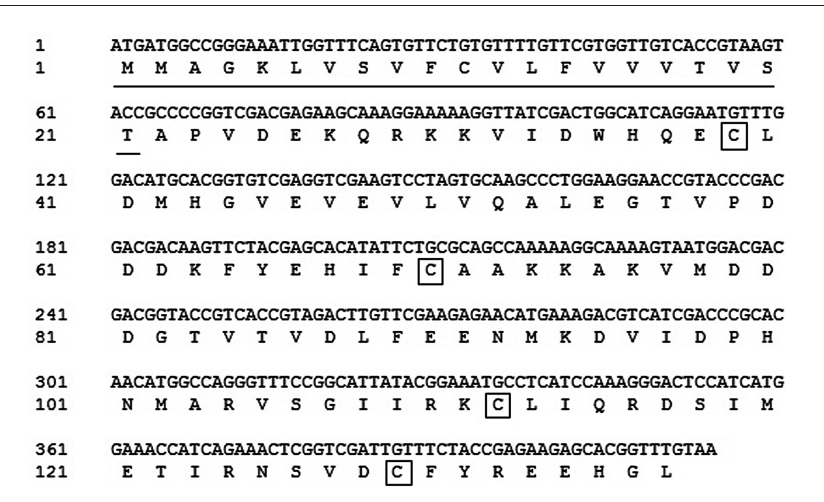


图 1　甘薯蚁象 *CforOBP8* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *CforOBP8* of *Cylas formicarius*

下划线表示预测的信号肽,方框内表示保守的半胱氨酸。The predicted signal peptide sequence is underlined, and the conserved cysteines are boxed.

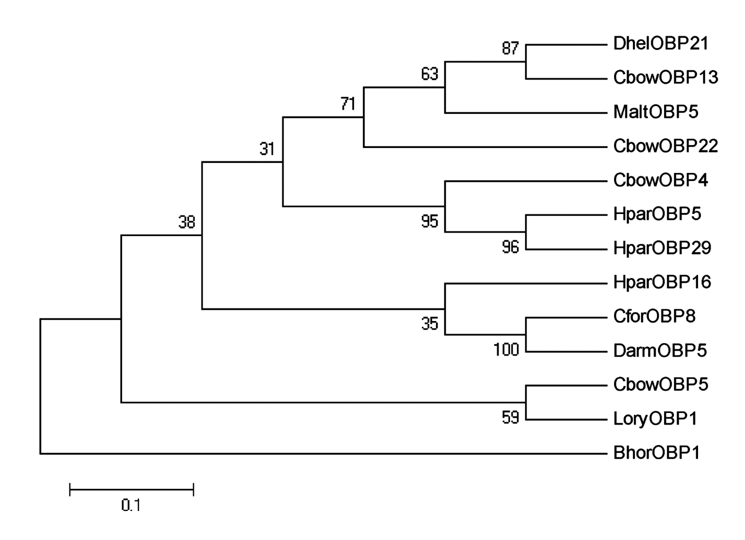


图 2　甘薯蚁象与鞘翅目其他昆虫基于 OBPs 氨基酸序列的系统发育树(邻接法)

Fig. 2　Phylogenetic tree of OBPs from *Cylas formicarius* and other insects of Coleoptera based on the amino acid sequence (neighbor-joining method)

OBPs 来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of OBPs and their GenBank accession numbers：华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi* (DarmOBP5：ALM64967.1)；花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides* (DhelOBP21：AIX970670.1)；大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* (CbowOBP4：ALR72492.1；CbowOBP5：ALR72493.1；CbowOBP13：ALR72501.1；CbowOBP22：ALR72510.1)；云斑天牛 *Batocera horsfieldi* (BhorOBP1：AHA33382.1P)；稻水象甲 *Lissorhoptrus oryzophilus* (LoryOBP1：AHE13800.1)；松墨天牛 *Monochamus alternatus* (MaltOBP5：AIX97020.1)；暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela* (HparOBP5：AKI84363.1；HparOBP16：AKI84374.1；HparOBP29：ALP75942.1)。图中数字为 bootstrap 检验值,1 000 次重复,标尺示遗传距离。Numerals in the figure are bootstrap values with 1 000 replicates. The scale bar indicates the genetic distance.

2.4　CforOBP8 与气味配体的结合能力分析

通过 Scachard 方程对 CforOBP8 与 1-NPN 的结合曲线进行线性化,计算出该蛋白与 1-NPN 的解离常数为 3.911 μmol/L(图 5：A)。采用荧光竞争结合实验测定 CforOBP8 与 16 种配体化合物的结合能力(图 5：B, 表 2),结果显示,CforOBP8 与性信息素组分(*E*)-2-丁烯酸顺-(*Z*)-3 十二烯基酯的结合能力最强,解离常数 K_i = 4.13 μmol/L,其次,与乙酸顺-3-己烯酯、柠檬烯、橙花醇、壬醛和苯乙醛具有一定结合能力,其解离常数 K_i 分别为 7.54, 15.23, 16.31, 28.71 和 29.54 μmol/L,与十一烷、苯甲醛、罗勒烯不能结合,与其他 7 种气味分子的结合能力较弱(K_i > 30 μmol/L)。

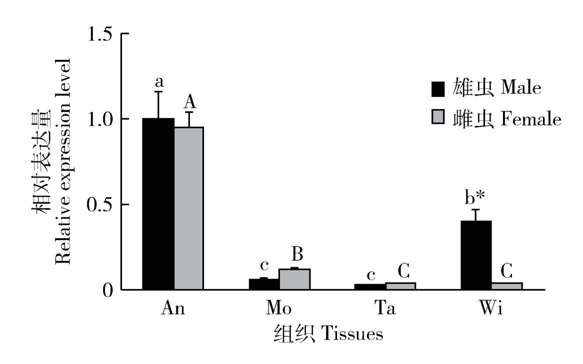


图 3 *CforOBP8* 在甘薯蚁象成虫不同组织中的表达量

Fig. 3 Expression levels of *CforOBP8* in different tissues of *Cylas formicarius* adults

An：触角 Antenna；Mo：口器 Mouthparts；Ta：跗节 Tarsus；Wi：翅 Wing. 柱上不同小写字母和大写字母分别表示雌虫和雄虫不同组织间的表达量差异显著（LSD 多重比较，$P<0.05$），而柱上星号表示同一组织雌雄虫之间的表达量差异显著（t 检验，$P<0.05$）. Different lowercase and capital letters above bars indicate significantly different expression levels among different tissues of the female and male, respectively (LSD multiple comparison, $P<0.05$), while the asterisk above bars indicates significantly different expression levels between female and male in the same tissue (t-test, $P<0.05$).

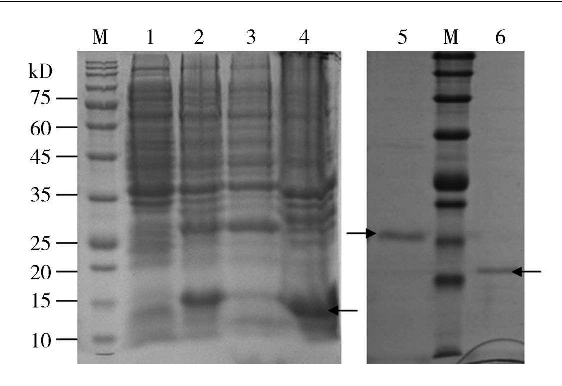


图 4 甘薯蚁象 CforOBP8 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant CforOBP8 of *Cylas formicarius*

M：蛋白标准分子量 Protein molecular weight marker；1：未经 IPTG 诱导的 pEASy/*CforOBP8*（Expressed product of pEASY/*CforOBP8* non-induced by IPTG）；2：经 IPTG 诱导的 pEASY/*CforOBP8*（Expressed product of pEASY/*CforOBP8* induced by IPTG）；3：pEASY/*CforOBP8* 经超声破碎后的上清 Supernatant of pEASY/*CforOBP8* after sonication；4：pEASY/*CforOBP8* 经超声破碎后的沉淀 Pellet of pEASY/*CforOBP8* after sonication；5：纯化的 CforOBP8 重组蛋白 Purified recombinant protein CforOBP8；6：重组肠激酶切除 His-tag 标签后的 CforOBP8 蛋白 Purified CforOBP8 with His-tag removed by recombinant enterokinase. 箭头指示目的条带。The target bands are marked by arrows.

表 2 甘薯蚁象 CforOBP8 重组蛋白与配体的结合能力

Table 2 Binding abilities of recombinant CforOBP8 from *Cylas formicarius* with different ligands

气味标样 Volatiles	CAS 登记号 CAS registry number	IC_{50} (μmol/L)	K_i (μmol/L)
植物挥发物 Plant volatiles			
十一烷 Undecane	1120-21-4	–	–
橙花醇 Nerol	106-25-2	22.92	16.31
香叶醇 Geraniol	106-24-1	65.17	42.30
芳樟醇 Linalool	78-70-6	52.96	38.44
乙酸-顺-3-己烯酯 (*Z*)-3-Hexen-1-ol acetate	3681-71-8	10.36	7.54
苯甲醛 Benzaldehyde	100-52-7	–	–
苯乙醛 Phenylacetaldehyde	122-78-1	40.71	29.54
壬醛 Nonanal	12419-6	39.56	28.71
罗勒烯 Ocimene	13877-91-3	–	–
柠檬烯 Limonene	138-86-3	20.98	15.23
α-蒎烯 α-Pinene	7785-70-8	42.51	30.85
莰烯 Camphene	565-00-4	46.71	33.90
葎草烯 Humulene	26259-79-0	64.58	46.87
石竹烯 Caryophyllene	87-44-5	72.73	52.78
法尼烯 Farnesene	502-61-4	31.42	31.80
性信息素 Sex pheromone			
(*E*)-2-丁烯酸顺-(*Z*)-3 十二烯基酯 (*Z*)-3-Dodecen-1-yl(*E*)-2-butenoate	104086-73-9	5.69	4.13

IC_{50}：结合 50% 1-NPN 时的化合物浓度 Concentration of compounds binding with 50% 1-NPN；–：无法计算出 Not detectable；K_i：蛋白与化合物的竞争解离常数 Competitive dissociation constant of a protein with a compound.

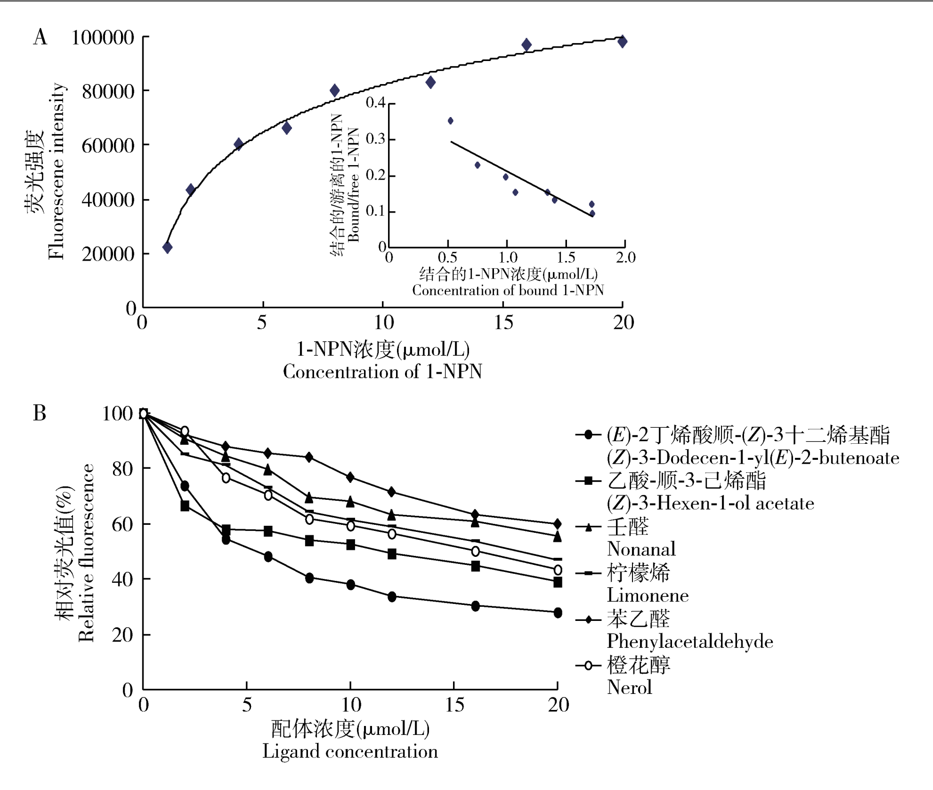


图 5　重组蛋白 CforOBP8 与 1-NPN 及配体的结合曲线

Fig. 5　Binding curves of the recombinant protein CforOBP8 to 1-NPN and ligands

A：CforOBP8 与 1-NPN 的结合曲线及 Scatchard 线性方程 Binding curve and Scatchard plot of CforOBP8 to 1-NPN；B：CforOBP8 与气味标样的结合曲线 Competitive binding curves of CforOBP8 to selected ligands.

3　讨论

OBPs 是昆虫识别、运输外界信息物质的首要元素，是实现不同气味信号辨别和传递的重要因子（王桂荣等，2002）。本研究基于甘薯蚁象转录组测序结果，克隆了气味结合蛋白基因 *CforOBP8*，序列分析显示，*CforOBP8* 基因编码的氨基酸 N 末端有 21 个氨基酸组成的信号肽，为外分泌蛋白；CforOBP8 具有 4 个保守的半胱氨酸残基，符合 Minus-C OBPs 家族蛋白的特征（Li *et al.*，2017）。在系统进化树中 *CforOBP8* 与 *DarmOBP5* 的亲缘关系最近，且序列比对结果显示，*CforOBP8* 与 *DarmOBP5* 的相似性最高，氨基酸序列一致性为 53.0%。从一定程度上说明亲缘关系越近，OBPs 间的序列相似性越高，而 *CforOBP8* 与 *DarmOBP5* 可能因为亲缘较近，则序列相似性最高，同时在嗅觉识别过程中也具有相似的功能。

昆虫的基因表达谱分析在一定程度上是反映其基因功能的重要途径（李兆群等，2017），本研究中 *CforOBP8* 在雌雄成虫触角、口器、跗节、翅中均有表达，但在触角中的表达量最高，显著高于其他组织，说明 *CforOBP8* 基因主要在触角中高表达或特异性表达。除触角外，昆虫其他组织也分布有嗅觉或味觉感器，可能与寄主植物的定位和选择有关（Li *et al.*，2013）。在甘薯蚁象雄虫中除触角外，OBP 在翅上也有较高的表达量，类似结果在其他昆虫中也有报道（Ma *et al.*，2016；Sun *et al.*，2016）。OBP 基因的雌雄虫偏向表达，可能在昆虫识别性信息素或借助寄主挥发物来寻找配偶及寄主等过程中发挥一定的作用（Li *et al.*，2015），*CforOBP8* 在雄成虫翅中的表达量明显高于雌成虫翅中的表达量，该结果很可能与雄虫在飞行中识别环境中的气味、寻找配偶、交配等行为有关。

本研究采用荧光竞争结合实验测定 CforOBP8 与来自甘薯等植物的 15 种气味物质及 1 种性信息素组分的结合能力。结果显示 CforOBP8 与其中 7 种配体化合物的结合能力较弱（$K_i > 30$ μmol/L），与 6 种配体化合物有一定的结合能力（$K_i < 30$ μmol/L），表明 CforOBP8 的气味化合物结合谱较窄。在结合的 6 种配体化合物中，CforOBP8 与性信息素的结合能力最强，说明 CforOBP8 行使的功能更

偏向性信素结合蛋白,能够参与甘薯蚁象信息素识别,特别是在雄虫寻找配偶过程中发挥重要的作用。有研究发现,气味化合物的碳链长短与蛋白结合的能力有关,在一定范围内,随着碳原子数量的增加,气味分子与蛋白的结合能力越弱(房迟琴等, 2016; 王超群等, 2017)。本研究中与 CforOBP8 结合能力较强的化合物依次为乙酸顺-3-已烯酯(8C)、柠檬烯(10C)、橙花醇(10C)、壬醛(9C)和苯乙醛(8C),表明 CforOBP8 与配体结合能力和碳链的长短关系不明显。乙酸顺-3-已烯酯、柠檬烯和橙花醇是甘薯蚁象寄主的主要挥发物(贾小俭等, 2017),对成虫有明显的电生理反应和行为活性,这些配体化合物与 CforOBP8 有一定的结合活性($K_i < 30$ μmol/L),其次为醛类物质壬醛(28.71 μmol/L)和苯乙醛(29.54 μmol/L),有报道醛基在触角感器淋巴液中溶解度较高,更容易被昆虫识别(程小娟等, 2016)。CforOBP8 与 7 种配体化合物的结合能力较弱($K_i >$ 30 μmol/L),甚至与 3 种配体化合物不能有效地结合,我们推测 CforOBP8 与寄主植物挥发物有明显的选择结合特性(Manoharan *et al*., 2013),也可能是甘薯蚁象需要依靠多种 OBPs 的协同作用对寄主挥发物进行识别、产卵、危害等。

综上所述,CforOBP8 很可能是一个性信息素结合蛋白,在甘薯蚁象识别寄主和寻找配偶过程中发挥重要作用。研究结果显示,CforOBP8 与 1 种性信息素和 5 种植物挥发物有一定的结合能力,这为甘薯蚁象引诱剂或驱避剂的开发提供了理论基础。另外,需要进一步通过 RNA 干扰等现代分子技术,敲除或沉默甘薯蚁象体内的 *CforOBP*8,来进一步验证该基因的功能。

参考文献 (References)

Ban L, Scalonib A, Angeli S, Zhang L, Yan Y, Pelosi P, 2003. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Mol. Biol*., 12(2): 125 – 134.

Cheng XJ, Cai LJ, Zheng LS, Qin JM, Huang YP, You MS, 2016. Cloning, expression profiling and binding characterization of the OBP2 gene in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomol. Sin*., 59(4): 365 – 376. [程小娟, 蔡立君, 郑丽双, 覃江梅, 黄宇萍, 尤民生, 2016. 小菜蛾气味结合蛋白 OBP2 基因的克隆、表达谱及其结合特性分析. 昆虫学报, 59(4): 365 – 376]

Fang CQ, Zhang XX, Liu DD, Li KB, Zhang S, Cao YZ, Fan D, Yin J, 2016. Cloning and functional analysis of an odorant-binding protein HparOBP15a gene from *Holotrichia parallela* (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta Entomol. Sin*., 59(3): 260 – 268. [房迟琴, 张鑫鑫, 刘丹丹, 李克斌, 张帅, 曹雅忠, 樊东, 尹姣, 2016. 暗黑鳃金龟气味结合蛋白 HparOBP15a 基因的克隆及功能分析. 昆虫学报, 59(3): 260 – 268]

Field LM, Pickett JA, Wadhams LJ, 2000. Molecular studies in insect olfaction. *Insect Mol. Biol*., 9(4): 545 – 551.

Jia XJ, Ma J, Gao B, Li XH, Zhang T, Chen SL, Wang RY, 2017. EAG and olfactory responses of *Cylas formicarius* (Coleoptera: Curculionidae) to volatiles from plants of different sweetpotato cultivars. *Acta Entomol. Sin*., 60(11): 1285 – 1291. [贾小俭, 马娟, 高波, 李秀花, 张涛, 陈书龙, 王容燕, 2017. 甘薯蚁象对不同甘薯品种植物挥发物的 EAG 和嗅觉反应. 昆虫学报, 60(11): 1285 – 1291]

Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol*., 58: 373 – 379.

Li L, Liu ZD, Sun JH, 2015. Olfactory cues in host and host-plant recognition of a polyphagous ectoparasitoid *Scleroderma guani*. *BioControl*, 60(3): 307 – 316.

Li ZQ, He P, Zhang YN, Dong SL, 2017. Molecular and functional characterization of three odorant-binding protein from *Periplaneta Americana*. *PLoS ONE*, 12(1): e0170072.

Li ZQ, Zhang S, Zhou SF, Luo JY, Cui JJ, 2017. Tissue expression profiling and ligand-binding properties of HarmOBP16 of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin*., 60(8): 891 – 899. [李兆群, 张帅, 周淑芬, 雒珺瑜, 崔金杰, 2017. 棉铃虫气味结合蛋白 HarmOBP16 的组织表达谱及配及结合特性分析. 昆虫学报, 60(8): 891 – 899]

Li ZQ, Zhang S, Zhou SF, Luo JY, Cui JJ, Ma Y, Dong SL, 2013. Two Minus-C odorant binding proteins from *Helicoverpa armigera* display higher ligand binding affinity at acidic pH than neutral pH. *J. Insect Physiol*., 59(3): 263 – 272.

Ma L, Li ZQ, Bian L, Cai XM, Luo ZX, Zhang YJ, Chen ZM, 2016. Identification and comparative study of chemosensory genes related to host selection by legs transcriptome analysis in the tea geometrid *Ectropis obliqua*. *PLoS ONE*, 11(3): e0149591.

Manoharan M, Chong MNF, Vaïtinadapoulé A, Frumence E, Sowdhamini R, Offmann B, 2013. Comparative genomics of odorant binding proteins in *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus*. *Genome Biol. Evol*., 5(1): 163 – 180.

Schmittgen TD, Livak KJ, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat. Protoc*., 3(6): 1101 – 1108.

Sun HZ, Song YQ, Du J, Wang XD, Cheng ZJ, 2016. Identification and tissue distribution of chemosensory protein and odorant binding protein genes in *Athetis dissimilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool*., 51(3): 409 – 420.

Wang CQ, Zhao Y, Cao YZ, Wei HS, Li KB, Zhang S, Peng Y, Yin J, 2017. Expression and binding characterization of odorant binding protein (AcorOBP1) in *Anomala corpulenta* (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Entomol. Sin*., 60(4): 363 – 371. [王超群, 赵莹, 曹雅忠, 魏红爽, 李克斌, 张帅, 彭宇, 尹姣, 2017. 铜绿丽金龟气味结合蛋白 AcorOBP1 的表达和结合特性分析. 昆虫学报, 60(4): 363 – 371]

Wang GR, Guo YY, Wu KM, 2002. Progress in the studies of antenna odorant binding proteins of insects. *Acta Entomol. Sin.*, 45 (1): 131 - 137. [王桂荣, 郭予元, 吴孔明, 2002. 昆虫触角气味结合蛋白的研究进展. 昆虫学报, 45(1): 131 - 137]

Wang RY, Chen SL, Wang LP, Zhang H, Fan KJ, Zou XM, 2015. Survey on occurrence of the sweetpotato weevil *Cylas formicarius* and preliminary study on the causes of its outbreak in Chongqing. *J. Agric.*, 5(1): 15 - 19. [王容燕, 陈书龙, 王良平, 张菡, 范开举, 邹祥明, 2015. 甘薯蚁象在重庆的发生调查及成灾原因初探. 农学学报, 5(1): 15 - 19]

Wang Y, Kays S, 2002. Sweetpotato volatile chemistry in relation to sweetpotato weevil (*Cylas formicarius*) behavior. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 127(4): 656 - 662.

Zhang RZ, 2015. *Cylas formicarlus* (F.). *Chin. J. Appl. Entomol.*, 52 (2): 418. [张润志, 2015. 甘薯蚁象 *Cylas formicarlus* (F.). 应用昆虫学报, 52(2): 418]

Zhou JJ, Robertson G, He XL, Dufour S, Hooper AM, Pickett JA, Keep NH, Field LM, 2009. Characterisation of *Bombyx mori* odorant-binding proteins reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. *J. Mol. Biol.*, 389(3): 529 - 545.

（责任编辑：马丽萍）